

УДК 577.218

ПОЛУЧЕНИЕ РАСТЕНИЙ ТАБАКА, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ГЕН *EcCspA* И ОБЛАДАЮЩИХ ПОВЫШЕННОЙ ХОЛОДОУСТОЙЧИВОСТЬЮ

А.С. Низкородова, Б.К. Искаков

РГП «Институт молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина», КН МОН РК,
ул. Досмухамедова, 86, Алматы, 050012, Казахстан
anna_niz@mail.ru

АБСТРАКТ

Одним из наиболее перспективных направлений по созданию трансгенных холодоустойчивых растений является использование в качестве конститутивно экспрессирующегося трансгена белков с РНК-шаперонными функциями. РНК-шаперонами называют белки, связывающие нуклеиновые кислоты (одноцепочечные РНК и ДНК) и дестабилизирующие их вторичные структуры, образующиеся при понижении температуры. Белки холодового шока (CSP) являются типичными представителями РНК-шаперонов; они обнаружены во всех видах живых организмов. Основной белок холодового шока *E. coli* CSPA состоит из 70 аминокислотных остатков и неспецифично связывает одноцепочечные РНК и ДНК. Нами было получено несколько линий трансгенных растений табака *Nicotiana tabacum* сорта *Samsun*, конститутивно экспрессирующих в цитоплазме белок EcCSPA. Было получено девять трансгенных линий табака, несущих в качестве трансгенной вставки ген *EcCspA* (линии обозначались как "А" с цифрой), и три трансгенные линии, в которых трансгенная вставка состояла из гена *EcCspA*, усиленного 5'-нетранслируемой последовательностью (НТП) Y-вируса картофеля (линии обозначались как "YA" с цифрой). 5'-НТП Y-вируса картофеля является признанным энхансером трансляции и использовалась нами для усиления экспрессии целевого белка в трансгенных растениях. Полученные растения были проверены на холодо- и морозоустойчивость. Нами было получено три трансгенных линии табака, продемонстрировавших 100%-ную выживаемость в условиях применённого холодового шока (линии А-20, YA-17, YA-20). Также две из полученных линий (YA-20 и А-27) после холодового шока показали статистически достоверное увеличение сырой массы наземной части растения на 30 и 57% по сравнению с контрольными растениями. Таким образом, можно констатировать экономическую оправданность получения холодоустойчивых сельскохозяйственных растений, трансгенных по гену *EcCspA*.

Ключевые слова: белки холодового шока (CSP), EcCSPA, трансгенные растения, экспрессия белка, холодоустойчивость.

TRANSGENIC TOBACCO PLANTS EXPRESSING GENE *EcCspA* TEND TO BE COLD RESISTANT

A.S. Nizkorodova, B.K. Iskakov

Institute of Molecular Biology and Biochemistry named after Aytchozhin M.A., Science Committee of
Ministry of Education and Science, 86 Dosmukhamedova str., Almaty, 050012, Kazakhstan
anna_niz@mail.ru

ABSTRACT

One of the most promising directions in creation of transgenic cold resistant plants is constitutive expression of transgenic RNA-chaperons. RNA-chaperons are proteins that bind nucleic acids (single stranded RNA and DNA) and destabilize their secondary structures which are formed by the decrease of temperature. Cold-shock proteins (CSP) are RNA-chaperons which present in all living organisms. The main cold-shock protein of *E. coli* CSPA is consist of 70 amino acids and binds single stranded RNAs and DNAs nonspecifically. We have obtained several lines of transgenic tobacco *Nicotiana tabacum* var. *Samsun* constitutively expressing protein EcCSPA in cytoplasm. There were nine transgenic tobacco lines carrying transgen *EcCspA* (marked as "A" with number) and three transgenic lines carrying transgen *EcCspA* which had 5'-untranslated region (UTR) of potato virus Y upstream (marked as "YA" with number). 5'-UTR of potato virus Y is well known translational enhancer; we used it for expression enhancement of goal protein in transgenic plants. We explored tolerance of transgenic plants to chilling and freezing. Three transgenic lines

demonstrated 100% survival under the conditions of cold shock (lines A-20, YA-17 and YA-20). Two of transgenic lines namely YA-20 and A-27 showed statistically valid increase in raw weight of plants green part after the cold shock. The raw weight gain was 30% (YA-20) and 57% (A-27) in compare with control plants. Thus, we constant economical expediency of creation of cold-resistant agricultural plants transgenic by *EcCspA*.

Keywords: cold shock proteins (CSP), *EcCSPA*, transgenic plants, protein expression, cold resistance.

ВВЕДЕНИЕ

Большая часть сельскохозяйственных культур весьма чувствительна к температурному режиму выращивания, реагируя резким падением урожайности в ответ на похолодание [1-3]. Стандартные методы селекции демонстрируют ограниченную успешность при получении холодоустойчивых сельскохозяйственных растений, поскольку для большинства чувствительных к холоду растений возникает необходимость в межвидовой или даже в межродовой гибридизации [1].

В настоящее время проблема повышения холодоустойчивости растений решается различными генно-инженерными методами, наиболее действенным среди которых следует признать получение трансгенных растений, конститутивно экспрессирующих ряд белков, имеющих отношение к холодовой адаптации растений [1]. В числе этих белков нужно назвать ряд транскрипционных факторов (*CBF1/DREB1b* [4-7], *Thp1* [8], *MYBS3* [9], *ZAT12* [10], *HOS10* [11], *abi3* [12]); РНК-шапероны (*CspB*, *CspA* [13] *AtCSP3* [14]); ферменты, участвующие в синтезе осмопротектантов пролина (*prodh* [15]), глицин-бетаина (*coda* [16, 17]) и фруктана (*sacB* [18]); ферменты, участвующие в биосинтезе ненасыщенных жирных кислот (*fad7* [19, 20], *gpat* [21]).

Одним из наиболее перспективных направлений по созданию трансгенных холодоустойчивых растений является использование в качестве конститутивно экспрессирующегося трансгена белков с РНК-шаперонными функциями [13]. РНК-шаперонами называют белки, связывающие нуклеиновые кислоты (одноцепочечные РНК и ДНК) и дестабилизирующие их вторичные структуры, образующиеся при понижении температуры [22-24]. Такие стабилизированные вторичные структуры РНК приводят к ингибированию транскрипции и трансляции, а также к деградации РНК, что в целом приводит к остановке жизнедеятельности клетки при понижении температуры [22, 25]. Считается, что РНК-шапероны, связываясь с подобными вторичными структурами, дестабилизируют их, переводя нуклеиновые кислоты в привычное «текучее» состояние, оптимальное для протекания молекулярных реакций [22, 23, 26].

Белки холодового шока (CSP) являются типичными представителями РНК-шаперонов; они обнаружены во всех видах живых организмов, причём структура доменов холодового шока имеет высокую гомологию, как между про-, так и эукариотами [14, 24-26]. Основной белок холодового шока *E. coli* CSPA состоит из 70 аминокислотных остатков, образующих пять антипараллельных β -слоёв и имеет два РНК-связывающих мотива RNP1 и RNP2 [23, 25]. Известно, что белок CSPA является антитерминатором транскрипции [27] и неспецифично связывает одноцепочечные РНК и ДНК [23].

В обширном исследовании *Castiglioni et al.* [13] было показано, что трансгенные проростки арабидопсиса и риса, экспрессирующие CSPA или CSPB, демонстрируют больший рост биомассы по сравнению с контрольными растениями при культивировании на +8°C. В работе *Kim et al.* [14] также приводятся данные о необходимости экспрессии *AtCSDP3* для развития холодоустойчивости у растений арабидопсиса. В то же время, в работе *Sasaki et al.* [25] содержатся данные, указывающие на то, что сверхэкспрессия *AtCSP2* в растениях арабидопсиса, приводит к снижению устойчивости к холоду, что напрямую указывает на неоднозначность функций белков холодового шока.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение плазмид. Последовательность гена *EcCspA* была синтезирована таким образом, как описывалось нами ранее [28]. Далее последовательность гена была клонирована в агробактериальный вектор pCambia2300 по сайтам эндонуклеаз рестрикции *Bam*HI и *Sal*I под контроль 35S промотора и терминатора вируса мозаики цветной капусты (CaMV) таким образом, что на N-конце белка EcCSPA при экспрессии синтезировалась последовательность гекса-His-tag. Также была получена агробактериальная конструкция, в которой последовательность гена *EcCspA* была дополнена с 5'-конца энхансером трансляции 5'-НТП Y-вируса картофеля.

Создание трансгенных линий табака. В качестве эксплантов использовали листовые диски растений табака сорта *Samsun* размером 1,5×1,5 см. Для трансформации эксплантов использовалась суспензия агробактериальных клеток (OD ~ 1,2), несущих соответствующую плазмиду, в базовой среде MS (Мурасиге-Скуга). Процедура генетической трансформации и последующей регенерации из каллусов трансформированных растений осуществлялась согласно [29]. В качестве селективного антибиотика использовался канамицин в концентрации 50 мг/мл [30]. Для элиминации агробактерий использовался антибиотик цефотаксим в концентрации 500 мг/мл [31]. Растения культивировались *in vitro* на среде MS с 3%-ным содержанием сахарозы, при 16-часовом световом дне и температуре +23...+25°C.

Выделение хромосомной ДНК. Выделение препаратов хромосомной ДНК растений проводилось двумя стандартными методами – с использованием СТАВ [32] и по методике *Edwards et. al* [33]. Растения-регенеранты проверяли на наличие трансгенной вставки ПЦР-анализом.

Выделение общего растворимого клеточного белка растений. Выделение белка проводилось двумя методами – мягким [34] с использованием детергентов и хаотропных ионов, и полным с использованием органического растворителя и хаотропного агента (выделение реагентом TRIzol) [35, 36].

Белковый электрофорез и иммунодетекция. Денатурирующий белковый электрофорез проводился в трис-трициновой системе согласно [37] при концентрации геля 12% Т и 3% С. Окраска гелей осуществлялась Page Blue Protein Staining Solution (“Fermentas”) согласно инструкции производителя. Перенос белков и последующая детекция проводилась на PVDF-мембране с использованием коммерческих антител anti-His HPR Conjugate (“5PRIME”) согласно инструкции производителя.

Проведение эксперимента на холодоустойчивость. Трансгенные и контрольные растения, выращенные в условиях *in vitro* из апикальных и пазушных меристем и достигшие возраста 2 недели, высаживались в стандартную почву и помещались в теплицу (16-часовой световой день, температура +30°C, относительная влажность 50%). Укоренение в почве проводилось в течение одной недели с ежедневным поливом. Далее растения помещались в климатическую камеру с температурным режимом +8°C / +4°C (дневная и ночная температуры) при 16-часовом световом дне. Эксперимент проводился в течение 5-ти суток, после чего растения помещались обратно в теплицу; восстановительный период продолжался одну неделю, далее выжившие растения использовались в эксперименте на морозоустойчивость.

Проведение эксперимента на морозоустойчивость. За сутки перед началом эксперимента растения помещали в климатическую камеру с температурным режимом +10°C. Далее растения переносили в морозильную камеру на –8°C на 4 часа, после чего опять помещали на сутки в климатическую камеру с температурным режимом +10°C.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Нами было получено более двадцати растений табака *Nicotiana tabacum* сорта *Samsun*, в которых детектировалась трансгенная вставка. Было получено девять трансгенных линий табака, несущих в качестве трансгенной вставки ген *EcCspA* (линии обозначались как “А” с цифрой), и три трансгенные линии, в которых трансгенная вставка состояла из гена *EcCspA*, усиленного 5'-нетранслируемой последовательностью (НТП) Y-вируса картофеля (линии обозначались как “YA” с цифрой). 5'-НТП Y-вируса картофеля является признанным энхансером трансляции [38-42] и использовалась нами в надежде на усиление экспрессии целевого белка в трансгенных растениях. Однако, при выделении общего растворимого белка по стандартной методике с использованием детергентов и хаотропных агентов [34] с последующим иммуноблоттингом ни в одном из полученных растений не детектировался белок EcCSPA. Поскольку детекцию проводили весьма чувствительным методом (хемилюминесцентный субстрат Promega ECL обладает чувствительностью 150-200 пкг), то даже при наличии небольшой экспрессии белок был бы определяем. Возможное посттранскрипционное молчание гена *EcCspA* нами даже не рассматривалось, поскольку данный белок был успешно экспрессирован группой *Castiglioni et.al.* в целом ряде растений [13]. В этом же исследовании было показано, что белки CspA и CspB, экспрессируемые в протопластах кукурузы, детектировались в ядре и цитозоле клеток в виде растворимого белка, а не клеточных нерастворимых включений. Принимая во внимание тот факт, что белок EcCSPA является РНК-шапероном и способен связываться с одноцепочечными нуклеиновыми кислотами [22, 23, 26, 27], нами было высказано предположение о том, что весь синтезируемый белок находится в комплексе с ДНК и РНК, и при выделении препарата общего белка выпадает в высокомолекулярный осадок вместе с нуклеиновыми кислотами.

Наиболее эффективным способом выделения белка из комплекса с нуклеиновой кислотой является его денатурирование каким-либо органическим растворителем [40]. Нами была использована методика с применением тризола, описанная у *Chomczynski P.* [35, 36]. В препаратах белка, полученных по указанной методике, нами детектировалась дополнительная полоса, соответствующая по электрофоретической подвижности димеру EcCSPA (рисунок 1). Причём данная полоса отсутствовала в препарате белка контрольных нетрансгенных растений. В то же время в препарате общего белка бактериального штамма (*E.coli* M15), индуцибельно экспрессирующего данный белок, детектировалась полоса со схожей электрофоретической подвижностью.

ВСТАВИТЬ РИС. 1.

При выделении белка по методике с применением тризола [35] и последующей иммунодетекции нами была зафиксирована экспрессия искомого белка (также в димерной форме) в ряде трансгенных линий. Так было определено девять трансгенных линий табака, несущих в качестве трансгенной вставки ген *EcCspA* (линии обозначались как “А” с цифрой), и три трансгенные линии, в которых трансгенная вставка состояла из гена *EcCspA*, усиленного 5'-НТП Y-вируса картофеля (линии обозначались как “YA” с цифрой).

Полученные трансгенные линии табака, экспрессирующие белок EcCSPA, были проверены нами на холодо- и морозоустойчивость. Анализ литературных источников показал, что используемое в настоящее время моделирование условий холодового стресса является весьма условным, так как не имеет никакого отношения к реальным климатическим и агротехническим условиям. Так, например, в работе *Castiglioni et.al.* [13] холодовой стресс для растений арабидопсиса, которые в принципе являются весьма холодоустойчивыми, достигался экспозицией на +8°C в течение 6-ти недель. В работе *Khodakovskaya et.al.* [19] экспозиция растений табака достигала 44-х дней (при +0,5 ... +3,5°C). В естественных условиях подобное длительное похолодание в

вегетационный период в принципе невозможно, что полностью нивелирует практическую ценность получаемых с помощью подобных моделей результатов. Холодовой стресс, моделируемый в лабораторных условиях, должен быть максимально приближен к похолоданию либо заморозкам, имеющим место в естественной среде. Поскольку табак относится к растениям, чувствительным к похолоданию [43], температурный режим $+8^{\circ}\text{C}$ в дневное время (16 часов) и $+4^{\circ}\text{C}$ в ночное является достаточным холодовым стрессом для этого вида. Похолодание в естественных условиях длится обычно несколько дней (имеется в виду весеннее похолодание, как единственно значимое для агросектора), поэтому было решено проводить экспозицию в холодových условиях в течение 5-ти дней. Что касается моделирования условий для проверки морозоустойчивости растений, нами были взяты за основу температурные перепады, естественные для предгорий – кратковременное (обычно не более 3-7-ми часов) падение температуры до -2°C ... -10°C [44]. Эксперимент по морозоустойчивости проводился в течение 4-х часов при -8°C .

Результаты опыта по холодоустойчивости представлены на рисунке 2. По окончании экспозиции растений в условиях холодového стресса (5-й день эксперимента) гибель растений наблюдалась для линий А-12, А-13, А-23, А-31, А-45, УА-16. Спустя пять дней реабилитационного периода в теплице наблюдалась последующая гибель растений, не справившихся с последствиями холодového шока. Гибель растений не наблюдалась только среди растений четырёх трансгенных линий А-11, А-20, УА-17 и УА-20. Среди растений контрольной группы потери от холодového шока составили 22%.

ВСТАВИТЬ РИС. 2.

Растения, выжившие в результате эксперимента по холодоустойчивости, были исследованы далее на морозоустойчивость. На одни сутки эти растения были помещены в климатическую камеру с температурой $+10^{\circ}\text{C}$, а затем в течение 4-х часов подвергались воздействию температуры -8°C , после чего опять были помещены на $+10^{\circ}\text{C}$. Далее растения были перенесены в теплицу с температурой $+30^{\circ}\text{C}$ на недельную реабилитацию. Гибель растений началась фактически сразу после извлечения их с -8°C ; обобщённые результаты по выжившим в экспериментах по холодо- и морозоустойчивости растениям представлены на рисунке 3.

ВСТАВИТЬ РИС. 3

Потери среди растений контрольной группы составили 33%; растения двух трансгенных линий (А-27 и УА-16) показали такой же уровень выживаемости, что и нетрансгенные (67%). Растения ещё пяти трансгенных линий продемонстрировали уровень выживаемости выше контрольного – 75% (линии А-11 и А-40) и 100% (А-20, УА-17 и УА-20). У растений остальных трансгенных линий потери от холодového шока были выше, чем среди растений контрольной группы.

Следует отметить, что растения линий “УА” показали очень хорошие результаты жизнестойкости в условиях холодového шока – линия УА-16 понесла потери схожие с таковыми у контрольной группы (33%), а линии УА-17 и УА-20 вообще не понесли потерь. Вполне возможно, что такими впечатляющими результатами данные трансгенные линии обязаны наличию у них трансляционного энхансера У-вируса картофеля.

По завершении реабилитационного периода после эксперимента по морозоустойчивости растения некоторых трансгенных линий серьёзно обогнали растения контрольной группы в росте. На рисунке 4 представлена фотография растений табака контрольной группы и двух трансгенных линий (УА-17 и УА-20), показавших 100%-ную выживаемость в экспериментах по холодо- и морозоустойчивости.

ВСТАВИТЬ РИС. 4

По окончании эксперимента по морозоустойчивости нами было решено проверить физиологическое состояние растений трансгенных линий наиболее простым и доступным способом – сравнить массу зелёных наземных частей растений трансгенных групп с таковой контрольной группы. Для сравнения брали только растения тех трансгенных линий, которые показали уровень выживаемости сходный или превышающий таковой у растений контрольной группы. Полученные результаты представлены на рисунке 5.

ВСТАВИТЬ РИС. 5

Масса наземной части растений табака всех трансгенных линий, за исключением двух, не показала достоверного отличия от массы растений контрольной группы (уровень значимости рассчитывали как t-критерий Стьюдента). Растения же линий А-27 и УА-20 показали достоверное увеличение массы наземной части растений на 57% (А-27) и 30% (УА-20). Таким образом, можно констатировать, что растения, по крайней мере, двух трансгенных линий, преодолели последствия холодового шока лучше, чем нетрансгенные растения. Также надо отметить, что растения линии УА-20 показали 100%-ный уровень выживаемости в экспериментах по холодо- и морозоустойчивости.

ВЫВОДЫ

Некоторые из полученных нами линий трансгенных растений табака *Nicotiana tabacum* var. *Samsun*, конститутивно экспрессирующих в цитоплазме белок EcCSPA, продемонстрировали холодо- и морозоустойчивость большую, чем у контрольных нетрансгенных растений. Три трансгенные линии табака (А-20, УА-17, УА-20) продемонстрировали 100%-ную выживаемость в условиях применённого холодового шока против 67%-ной растений контрольной группы. Две из полученных линий (УА-20 и А-27) после холодового шока показали статистически достоверное увеличение сырой массы наземной части растения на 30 и 57% по сравнению с контрольными растениями. Также необходимо отметить целесообразность использования 5'-НТП У-вируса картофеля в качестве усилителя экспрессии белка EcCSPA: 67% линий растений трансгенных по вставке 5'PVY-EcCspA (две из трёх), показали 100%-ную выживаемость, в то время как из девяти линий трансгенных по вставке EcCspA, только одна (11%) продемонстрировала такую же выживаемость. Таким образом, можно констатировать экономическую оправданность получения холодоустойчивых сельскохозяйственных растений, трансгенных по гену EcCspA.

Финансирование

Статья подготовлена в рамках проекта 0225 ГФ. «Молекулярно-биологические, биохимические и технологические основы для повышения продовольственной безопасности».

ЛИТЕРАТУРА

1. Sanghera G.S., Wani S.H., Hussain W., Singh N.B. Engineering cold stress tolerance in crop plants // *Current Genomics*. – 2011. – Vol. 12. – P. 30-43.
2. Yamori W., Noguchi K., Hikosaka K., Terashima I. Phenotypic plasticity in photosynthetic temperature acclimation among crop species with different cold tolerances // *Plant Physiology*. – 2010. – Vol. 152. – P. 388-399.

3. Huang L., Ye Zh., Bell R.W., Dell B. Boron nutrition and chilling tolerance of warm climate crop species // *Annals of Botany*. – 2005. – Vol. 96. – P. 755-767.
4. Zhang Y.J., Yang J.S., Guo S.J., Meng J.J., Zhang Y.L., Wan S.B., He Q.W., Li X.G. Over-expression of the *Arabidopsis* *CBF1* gene improves resistance of tomato leaves to low temperature under low irradiance // *Plant Biol*. – 2011. – Vol. 13(2). – P.362-367.
5. Lee S.C., Won H.K., An K., An G., Kim S.R. Ectopic expression of a cold-inducible transcription factor, *CBF1/DREB1b*, in transgenic rice (*Oryza sativa* L.) // *Mol. Cells*. – 2004. – Vol. 18. – P. 107-114.
6. Jaglo-Ottosen K.R., Gilmour S.J., Zarka D.G., Schabenberger O., Thomashow M.F. *Arabidopsis* *CBF1* overexpression induces *COR* genes and enhances freezing tolerance // *Science*. – 1998. – Vol. 280. – P. 104-106.
7. Liu Q., Ksauga M., Sakuma Y., Abe H., Miura S., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. Two transcription factors, *DREB1* and *DREB2*, with an *EREBP/AP2* DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought and lowtemperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis* // *Plant Cell*. – 1998. – Vol. 10. – P. 1391-1406.
8. Zhu B., Xiong A.S., Peng R.H., Xu J., Jin X.F., Meng X.R., Quan-Hong Y. Over-expression of *ThpI* from *Choristoneura fumiferana* enhances tolerance to cold in *Arabidopsis* // *Mol. Biol. Rep.* – 2010. – Vol. 37. – P. 961-966.
9. Su C.F., Wang Y.C., Hsieh T.H., Lu C.A., Tseng T.H., Yu S.M. A novel *MYBS3*-dependent pathway confers cold tolerance in rice // *Plant Physiol.* – 2010. – Vol. 153. – P. 145-158.
10. Vogel J.T., Zarka D.G., Van Anbuskirk H.A., Fowler S.G., Thomashow M.F. Roles of the *CBF2* and *ZAT12* transcription factors in configuring the low temperature transcriptome of *Arabidopsis* // *Plant J.* – 2005. – Vol. 41. – P. 195-211.
11. Zhu J., Verslues P.E., Zheng X., Lee B.H., Zhan X., Manabe Y., Sokolchik I., Zhu Y., Dong C.H., Zhu J.K., Hasegawa P.H., Bressan R.A. *HOS10* encodes an R2R3-type MYB transcription factor essential for cold acclimation in plants // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2005. – Vol. 102. – P. 9966-9971.
12. Tamminen I., Mäkelä P., Heino P., Palva E.T. Ectopic expression of *ABI3* gene enhances freezing tolerance in response to abscisic acid and low temperature in *Arabidopsis thaliana* // *Plant J.* – 2001. – Vol. 25. – P. 1-8.
13. Castiglioni P., Warner D., Bensen R.J., Anstrom D.C., Harrison J., Stoecker M., Abad M., Kumar G., Salvador S., D'Ordine R., Navarro S., Back S., Fernandes M., Targolli J., Dasgupta S., Bonin C., Luethy M.H., Heard J.E. Bacterial RNA chaperones confer abiotic stress tolerance in plants and improved grain yield in maize under water-limited conditions // *Plant Physiology*. – 2008. – Vol. 147. – P. 446-455
14. Kim M.H., Sasaki K., Imai R. Cold shock domain protein 3 regulates freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana* // *J. Biol. Chem.* – 2009. – Vol. 284. – P. 23454-23460.
15. Nanjo T., Kobayashi M., Yoshida Y., Kakubari Y., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. Antisense suppression of proline degradation improves tolerance to freezing and salinity in *Arabidopsis thaliana* // *FEBS Lett.* – 1999. – Vol. 461. – P. 205-210.
16. Sakamoto A., Murata A.N. Metabolic engineering of rice leading to biosynthesis of glycinebetaine and tolerance to salt and cold // *Plant Mol. Biol.* – 1998. – Vol. 38. – P. 1011-1019.
17. Hayashi H., Sakamoto A., Nonaka H., Chen T.H.H., Murata N. Enhanced germination under high-salt conditions of seeds of transgenic *Arabidopsis* with a bacterial gene (*codA*) for choline oxidase // *J. Plant Res.* – 1998. – Vol. 111. – P. 357-362.
18. Pilon-Smits E.A.H., Ebskamp M.J.M., Paul M.J., Jeuken M.J.W., Weisbeek P.J., Smeeckens S.C.M. Improved performance of transgenic fructan-accumulating tobacco under drought stress // *Plant Physiol.* – 1995. – Vol. 107. – P. 125-130.

19. Khodakovskaya M., McAvoy R., Peters J., Wu H., Li Y. Enhanced cold tolerance in transgenic tobacco expressing a chloroplast omega-3 fatty acid desaturase gene under the control of a cold-inducible promoter // *Planta*. – 2006. – Vol. 223(5). – P. 1090-1100.
20. Kodama H., Hamada T., Horiguchi C., Nishimura M., Iba K. Genetic enhancement of cold tolerance by expression of a gene for chloroplast Ω -3 fatty acid desaturase in transgenic tobacco // *Plant Physiol*. – 1994. – Vol. 105. – P. 601-605.
21. Murata N., Ishizaki-Nishizawa O., Higashi S., Hayashi S., Tasaka Y., Nishida I. Genetically engineered alteration in the chilling sensitivity of plants // *Nature*. – 1992. – Vol. 356. – P. 710-713.
22. Phadtare S., Severinov K. RNA remodeling and gene regulation by cold shock proteins // *RNA Biology*. – 2010. – Vol. 7(6). – P. 788-795.
23. Jiang W., Hou Y., Inouye M. CspA, the major cold-shock protein of *Escherichia coli*, is an RNA chaperone // *The journal of biological chemistry*. – 1997. – Vol. 272(1). – P. 196-202.
24. Kim M.H., Sonoda Y., Sasaki K., Kaminaka H., Imai R. Interactome analysis reveals versatile functions of *Arabidopsis* COLD SHOCK DOMAIN PROTEIN 3 in RNA processing within the nucleus and cytoplasm // *Cell Stress Chaperones*. – 2013. – Vol. 18(4). – P. 517-525. doi: 10.1007/s12192-012-0398-3.
25. Sasaki K., Kim M.H., Imai R. *Arabidopsis* Cold shock domain protein 2 is a negative regulator of cold acclimation // *New Phytol*. – 2013. – Vol. 198(1). – P. 95-102.
26. Ermolenko D.N., Makhatazde G.I. Bacterial cold-shock proteins // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2001. – Vol. 59. – P. 1902-1913.
27. Bae W., Xia B., Inouye M., Severinov K. *Escherichia coli* CspA-family RNA chaperones are transcription antiterminators // *PNAS*. – 2000. – Vol. 97(14). – P. 7784-7789.
28. Низкородова А.С., Полянская Е.В., Смагулова А.М., Искаков Б.К. Клонирование, экспрессия гена *EcCspA* и очистка кодируемого им белка // *Биотехнология. Теория и Практика*. – 2013. – №3. – С. 71-74.
29. Xian-Yan W., Xiao-Yi S., Ai-Fang Y., Ju-Ren Z. Construction of plant expression vector and analysis of herbicide resistance and salt tolerance of transgenic tobacco // *Chinese Journal of Agricultural Biotechnology*. – 2004. – Vol. 1. – P. 85-91.
30. Opabode J.T. *Agrobacterium*-mediated transformation of plants: emerging factors that influence efficiency // *Biotechnology and Molecular Biology Review*. – 2006. – Vol. 1. – P. 12-20.
31. Shackelford N.J., Chlan C.A. Identification of antibiotics that are effective in eliminating *Agrobacterium tumefaciens* // *Plant Mol Biol Rep*. – 1996. – Vol. 14. – P. 50-57.
32. Doyle J.J., Doyle J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue // *Phytochem Bull*. – 1987. – Vol. 19. – P. 11-15.
33. Edwards K., Johnstone C., Thompson C. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis // *Nucleic Acids Res*. – 1991. – Vol. 19. – P. 1349.
34. Giavalisco P., Nordhoff E., Lehrach H., Gobom J., Klose J. Extraction of proteins from plant tissues for two-dimensional electrophoresis analysis // *Electrophoresis*. – 2003. – Vol. 24. – P. 207-216.
35. Chomczynski P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cells and tissue samples // *BioTechniques*. – 1993. – Vol. 15. – P. 532-537.
36. Chomczynski P., Mackey K. Modification of the TRI Reagent procedure for the isolation of RNA from polysaccharides and proteoglycan-rich sources // *BioTechniques*. – 1995. – Vol. 19. – P. 942-945.
37. Schägger H. Tricine-SDS-PAGE // *National Protocols*. – 2006. – Vol. 1. – P. 16-22.
38. Nizkorodova A.S., Isakov B.K. Cell-Free synthesis optimization of barley vacuolar Na^+/H^+ -antiporter, a highly hydrophobic protein // *The Asian and Australasian Journal of Plant Science and Biotechnology*. – 2010 – Vol. 4. – P. 52-55.

39. Низкородова А.С., Искаков Б.К. Экспрессия гена β -глюкуронидазы в листовых дисках *Nicotiana tabacum* // Биотехнология. Теория и Практика. – 2009. – №1. – С. 60-65.
40. Dowson D., Dixon R.A. Plant viral leaders influence expression of a reporter gene in tobacco // *Plant Mol. Biol.* – 1993. – Vol. 23. – P. 97-109.
41. Levis C., Astier-Manificier S. The 5'-untranslated region of PVY RNA even located in an internal position enables initiation of translation // *Virus Genes.* – 1993. – Vol. 7. – P. 367-379.
42. Akbergenov R.Zh., Zhanybekova S.Sh., Kryldakov R.V., Zhigailov A., Polimbetova N.S., Hohn T., Iskaikov B.K. ARC-1, a sequence element complementary to an internal 18S rRNA segment, enhances translation efficiency in plants when present in the leader or intercistronic region of mRNAs // *Nucleic Acids Research.* – 2004. – Vol. 32. – P. 239-247.
43. Kratsch H.A., Wise R.R. The ultrastructure of chilling stress // *Plant, Cell and Environment.* – 2000. – Vol. 23. – P. 337-350.
44. Алиев И.Н., Панков Я.В. Естественная растительность на техногенных землях в Кабардино-Балкарской республике / под ред. Я.В. Панкова. – М.: Наука, 2011. – 160 с.

REFERENCES

1. Sanghera G.S., Wani S.H., Hussain W., Singh N.B. Engineering cold stress tolerance in crop plants. *Current Genomics*, 2011, vol. 12, pp. 30-43.
2. Yamori W., Noguchi K., Hikosaka K., Terashima I. Phenotypic plasticity in photosynthetic temperature acclimation among crop species with different cold tolerances. *Plant Physiology*, 2010, vol. 152, pp. 388-399.
3. Huang L., Ye Zh., Bell R.W., Dell B. Boron nutrition and chilling tolerance of warm climate crop species. *Annals of Botany*, 2005, vol. 96, pp. 755-767. doi:10.1093/aob/mci228.
4. Zhang Y.J., Yang J.S., Guo S.J., Meng J.J., Zhang Y.L., Wan S.B., He Q.W., Li X.G. Overexpression of the Arabidopsis CBF1 gene improves resistance of tomato leaves to low temperature under low irradiance. *Plant Biol*, 2011, vol. 13(2), pp. 362-367. doi: 10.1111/j.1438-8677.2010.00365.x.
5. Lee S.C., Won H.K., An K., An G., Kim S.R. Ectopic expression of a cold-inducible transcription factor, CBF1/DREB1b, in transgenic rice (*Oryza sativa* L.). *Mol. Cells.*, 2004, vol. 18, pp. 107-114.
6. Jaglo-Ottosen K.R., Gilmour S.J., Zarka D.G., Schabenberger O., Thomashow M.F. Arabidopsis CBF1 overexpression induces COR genes and enhances freezing tolerance. *Science*, 1998, vol. 280, pp. 104-106.
7. Liu Q., Ksauga M., Sakuma Y., Abe H., Miura S., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought and lowtemperature-responsive gene expression, respectively, in Arabidopsis. *Plant Cell.*, 1998, vol. 10, pp. 1391-1406.
8. Zhu B., Xiong A.S., Peng R.H., Xu J., Jin X.F., Meng X.R., Quan-Hong Y. Overexpression of ThpI from *Choristoneura fumiferana* enhances tolerance to cold in Arabidopsis. *Mol. Biol. Rep.*, 2010, vol. 37, pp. 961-966.
9. Su C.F., Wang Y.C., Hsieh T.H., Lu C.A., Tseng T.H., Yu S.M. A novel MYBS3-dependent pathway confers cold tolerance in rice. *Plant Physiol.*, 2010, vol. 153, pp. 145-158.
10. Vogel J.T., Zarka D.G., Van Anbuskirk H.A., Fowler S.G., Thomashow M.F. Roles of the CBF2 and ZAT12 transcription factors in configuring the low temperature transcriptome of Arabidopsis. *Plant J.*, 2005, vol. 41, pp. 195-211.
11. Zhu J., Verslues P.E., Zheng X., Lee B.H., Zhan X., Manabe Y., Sokolchik I., Zhu Y., Dong C.H., Zhu J.K., Hasegawa P.H., Bressan R.A. HOS10 encodes an R2R3-type MYB transcription factor essential for cold acclimation in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005, vol. 102, pp. 9966-9971.

12. Tamminen I., Mäkelä P., Heino P., Palva E.T. Ectopic expression of *ABI3* gene enhances freezing tolerance in response to abscisic acid and low temperature in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, 2001, vol. 25, pp. 1-8.

13. Castiglioni P., Warner D., Bensen R.J., Anstrom D.C., Harrison J., Stoecker M., Abad M., Kumar G., Salvador S., D'Ordine R., Navarro S., Back S., Fernandes M., Targolli J., Dasgupta S., Bonin C., Luethy M.H., Heard J.E. Bacterial RNA chaperones confer abiotic stress tolerance in plants and improved grain yield in maize under water-limited conditions. *Plant Physiology*, 2008, vol. 147, pp. 446-455.

14. Kim M.H., Sasaki K., Imai R. Cold shock domain protein 3 regulates freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.*, 2009, vol. 284, pp. 23454-23460.

15. Nanjo T., Kobayashi M., Yoshida Y., Kakubari Y., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. Antisense suppression of proline degradation improves tolerance to freezing and salinity in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.*, 1999, vol. 461, pp. 205-210.

16. Sakamoto A., Murata A.N. Metabolic engineering of rice leading to biosynthesis of glycinebetaine and tolerance to salt and cold. *Plant Mol. Biol.*, 1998, vol. 38, pp. 1011-1019.

17. Hayashi H., Sakamoto A., Nonaka H., Chen T.H.H., Murata N. Enhanced germination under high-salt conditions of seeds of transgenic *Arabidopsis* with a bacterial gene (*codA*) for choline oxidase. *J. Plant Res.*, 1998, vol. 111, pp. 357-362.

18. Pilon-Smits E.A.H., Ebskamp M.J.M., Paul M.J., Jeuken M.J.W., Weisbeek P.J., Smekens S.C.M. Improved performance of transgenic fructan-accumulating tobacco under drought stress. *Plant Physiol.*, 1995, vol. 107, pp. 125-130.

19. Khodakovskaya M., McAvoy R., Peters J., Wu H., Li Y. Enhanced cold tolerance in transgenic tobacco expressing a chloroplast omega-3 fatty acid desaturase gene under the control of a cold-inducible promoter. *Planta*, 2006, vol. 223(5), pp. 1090-100.

20. Kodama H., Hamada T., Horiguchi C., Nishimura M., Iba K. Genetic enhancement of cold tolerance by expression of a gene for chloroplast Ω -3 fatty acid desaturase in transgenic tobacco. *Plant Physiol.*, 1994, vol. 105, pp. 601-605.

21. Murata N., Ishizaki-Nishizawa O., Higashi S., Hayashi S., Tasaka Y., Nishida I. Genetically engineered alteration in the chilling sensitivity of plants. *Nature*, 1992, vol. 356, pp. 710-713.

22. Phadtare S., Severinov K. RNA remodeling and gene regulation by cold shock proteins. *RNA Biology*, 2010, vol. 7(6). – pp. 788-795.

23. Jiang W., Hou Y., Inouye M. CspA, the major cold-shock protein of *Escherichia coli*, is an RNA chaperone. *The journal of biological chemistry*, 1997, vol. 272(1), pp. 196-202.

24. Kim M.H., Sonoda Y., Sasaki K., Kaminaka H., Imai R. Interactome analysis reveals versatile functions of *Arabidopsis* COLD SHOCK DOMAIN PROTEIN 3 in RNA processing within the nucleus and cytoplasm. *Cell Stress Chaperones*, 2013, vol. 18(4), pp. 517-525. doi: 10.1007/s12192-012-0398-3.

25. Sasaki K., Kim M.H., Imai R. *Arabidopsis* Cold shock domain protein 2 is a negative regulator of cold acclimation. *New Phytol.*, 2013, vol. 198(1), pp. 95-102. doi: 10.1111/nph.12118.

26. Ermolenko D.N., Makhatadze G.I. Bacterial cold-shock proteins. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2001, vol. 59, pp. 1902-1913.

27. Bae W., Xia B., Inouye M., Severinov K. *Escherichia coli* CspA-family RNA chaperones are transcription antiterminators. *PNAS*, 2000, vol. 97(14), pp. 7784-7789.

28. Nizkorodova A.S., Polyanskaya E.V., Smagulova A.M., Iskakov B.K. Клонирование, экспрессия гена *EcCspA* и очистка кодируемого им белка [Cloning, expression and purification of *E. coli* cold-shock protein A]. *Biotechnology. Theory and Practice*, 2013, vol. 3, pp. 71-74. doi: 10.11134/btp.3.2013.12.

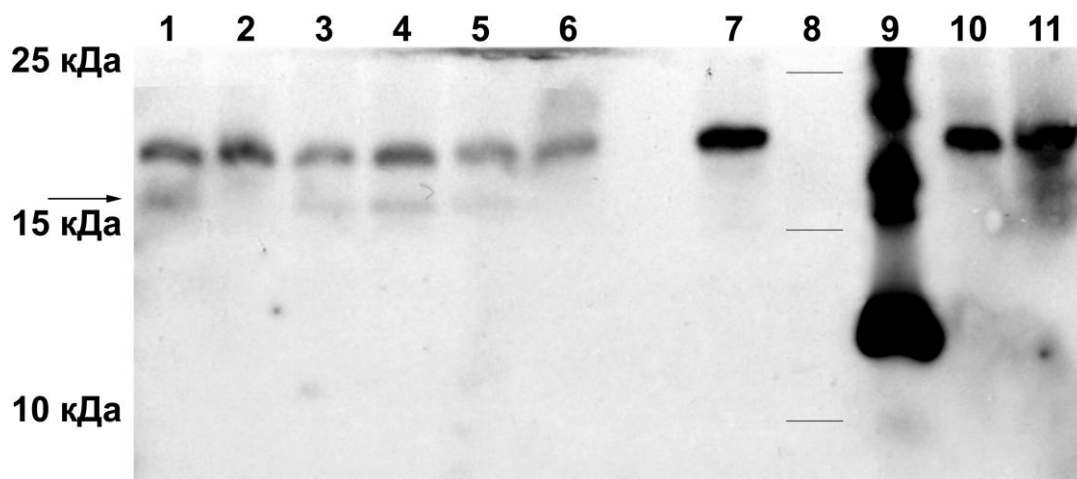
29. Xian-Yan W., Xiao-Yi S., Ai-Fang Y., Ju-Ren Z. Construction of plant expression vector and analysis of herbicide resistance and salt tolerance of transgenic tobacco. *Chinese Journal of Agricultural Biotechnology*, 2004, vol. 1, pp. 85-91.
30. Opabode J.T. Agrobacterium-mediated transformation of plants: emerging factors that influence efficiency. *Biotechnology and Molecular Biology Review*, 2006, vol. 1, pp. 12-20.
31. Shackelford N.J., Chlan C.A. Identification of antibiotics that are effective in eliminating *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Mol Biol Rep.*, 1996, vol. 14, pp. 50-57.
32. Doyle J.J., Doyle J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull.*, 1987, vol. 19, pp. 11-15.
33. Edwards K., Johnstone C., Thompson C. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Res.*, 1991, vol. 19, pp. 1349.
34. Giavalisco P., Nordhoff E., Lehrach H., Gobom J., Klose J. Extraction of proteins from plant tissues for two-dimensional electrophoresis analysis. *Electrophoresis*, 2003, vol. 24, pp. 207-216.
35. Chomczynski P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cells and tissue samples. *BioTechniques*, 1993, vol. 15, pp. 532-537.
36. Chomczynski P., Mackey K. Modification of the TRI Reagent procedure for the isolation of RNA from polysaccharides and proteoglycan-rich sources. *BioTechniques*, 1995, vol. 19, pp. 942-945.
37. Schägger H. Tricine-SDS-PAGE. *National Protocols*, 2006, vol. 1, pp. 16-22.
38. Nizkorodova A.S., Iskakov B.K. Cell-Free synthesis optimization of barley vacuolar Na⁺/H⁺-antiporter, a highly hydrophobic protein. *The Asian and Australasian Journal of Plant Science and Biotechnology*, 2010, vol. 4, pp. 52-55.
39. Nizkorodova A.S., Iskakov B.K. Jekspressija gena β -gljukuronidazy v listovyh diskah *Nicotiana tabacum* [β -glucuronidase gene expression in leaf discs of *Nicotiana tabacum*]. *Biotechnology. Theory and Practice*, 2009, vol. 1, pp. 60-65.
40. Dowson D., Dixon R.A. Plant viral leaders influence expression of a reporter gene in tobacco. *Plant Mol. Biol.*, 1993, vol. 23, pp. 97-109.
41. Levis C., Astier-Manifacier S. The 5'-untranslated region of PVY RNA even located in an internal position enables initiation of translation. *Virus Genes.*, 1993, vol. 7, pp. 367-379.
42. Akbergenov R.Zh., Zhanybekova S.Sh., Kryldakov R.V., Zhigailov A., Polimbetova N.S., Hohn T., Iskakov B.K. ARC-1, a sequence element complementary to an internal 18S rRNA segment, enhances translation efficiency in plants when present in the leader or intercistronic region of mRNAs. *Nucleic Acids Research*, 2004, vol. 32, pp. 239-247.
43. Kratsch H.A., Wise R.R. The ultrastructure of chilling stress. *Plant, Cell and Environment*, 2000, vol. 23, pp. 337-350.
44. Aliev I.N., Pankov Y.V. Estestvennaja rastitel'nost' na tehnogennyh zemljah v Kabardino-Balkarskoj respublike [Natural flora on anthropogenic lands in Kabardino-Balkaria]. Red. Y.V. Pankov. Moscow: Nauka, 2011, 160 p.

ТҮЙІН

Трансгенді РНҚ шаперонының конститутивті экспрессиясы, трансгенді суыққа төзімді өсімдіктер алу бойынша басты перспективалы бағыттардың бірі. РНҚ-шаперондар деп нуклейнді қышқылдарды (бір тізбекті РНҚ және ДНҚ) байланыстыратын және температураның төмендеуі кезінде қалыптасқан олардың қайталама құрылымдарын тұрақсыздандыратын ақуыздарды атайды. Суық шок ақуыздары (CSP) РНҚ шаперондарының типтік өкілдері болып табылады; олар тірі организмдердің барлық түрлерінде байқалған. *E.coli* CSPA негізгі суық шок ақуызы 70 амин қышқыл қалдығынан құралады және бір тізбекті РНҚ мен ДНҚ-ларды ерекшеліксіз байланыстырады. Біз

цитоплазмасында конститутивті EcCSPA ақуызын экспрессиялайтын *Nicotiana tabacum* var *Samsun* трансгенді темекі өсімдіктерінің бірнеше сорттармақтарын алдық. 9 трансгенді темекі сорттармағы EcCspa трансгенін алып жүретін (сорттармақтар сандармен «А» деп белгіленді), ал үш трансгенді сорттармақ 5' трансляцияланбаған ауданы (5'-НТП) картоптың Y вирусы мен күшейтілген EcCspa генінен құралған трансгенді алып жүретін (бұл сорттармақтар «YA» деп белгіленді) сорттармақтар алынды. 5'-НТП картоптың Y вирусы трансляция энхансеры ретінде белгілі, біз оны трансгенді өсімдіктерде толық ақуыз экспрессиясын күшейту үшін қолдандық. Алынған өсімдіктер суыққа және аязға төзімділікке тексерілді. Біз алған үш трансгенді темекі сорттармағы (А-20, YA-17, YA-20) суық шокті қабылдаған жағдайда 100%-дық тіршілікке бейімділігін байқатты. А-20 және А-27 екі сорттармақ суық шоктан кейін бақылаудағы өсімдіктермен салыстырғанда жасыл бөлегінің ылғал массасы 30% (А-20), 57% (А-27) артатындығын статистикалық нақты көрсетті. Қорыта келгенде EcCSPA гені бойынша суыққа төзімді ауылшаруашылық трансгенді өсімдіктерін алу экономикалық жағынан тиімді деп қорытынды жасауға болады.

Кілтті сөздер: суық шок ақуыздары (CSP), EcCSPA, трансгенді өсімдіктер, экспрессия, суыққа төзімділік.

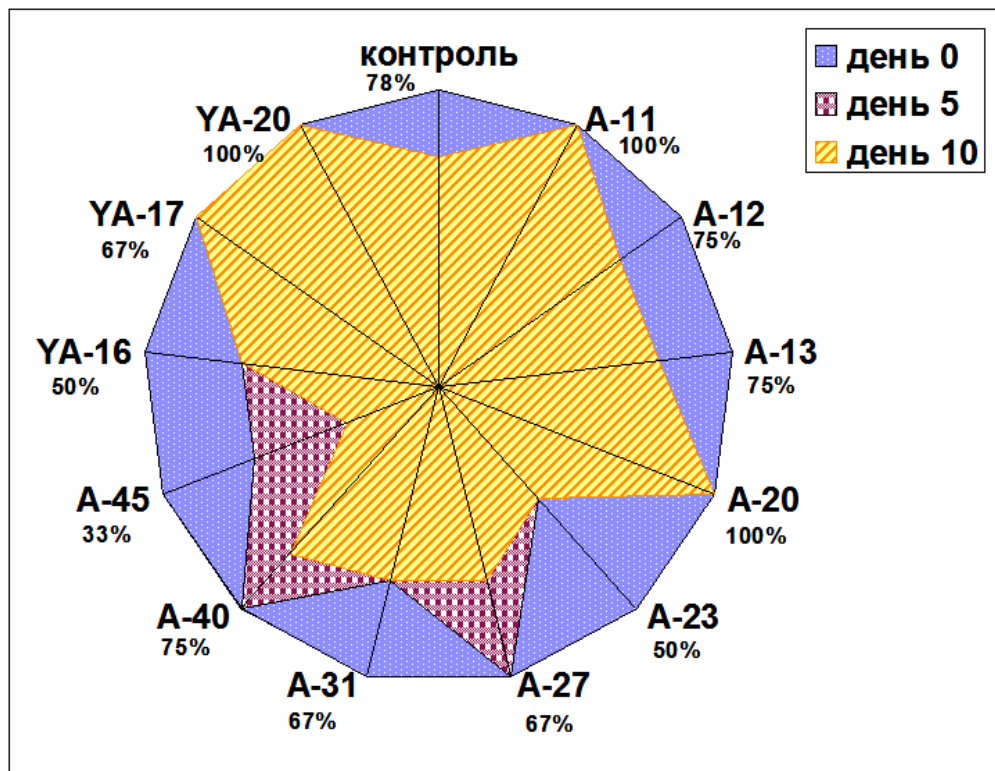


Дорожки: 1-6, 10, 11 – препараты белка трансгенных растений; 7 – препарат белка контрольного растения; 8 – белковый маркер Spectra Multicolor Low Range Protein Ladder (Thermo Scientific); 9 – препарат общего белка бактериального штамма *E.coli*, экспрессирующего трансгенный EcCSPA. Дополнительная полоса, соответствующая димеру EcCSPA, показана стрелкой.

Рис. 1. Результат иммуноблоттинга белка EcCSPA в трансгенных растениях

Lanes: 1-6, 10, 11 – total protein from transgenic plants; 7 – total protein from control plant; 8 – protein ladder Spectra Multicolor Low Range (Thermo Scientific); 9 – total cell protein of *E.coli* strain, expressing transgenic EcCSPA. Additional band corresponding to dimeric form of EcCSPA is shown with arrow.

Fig. 1. Results of EcCSPA immunoblotting in transgenic plants

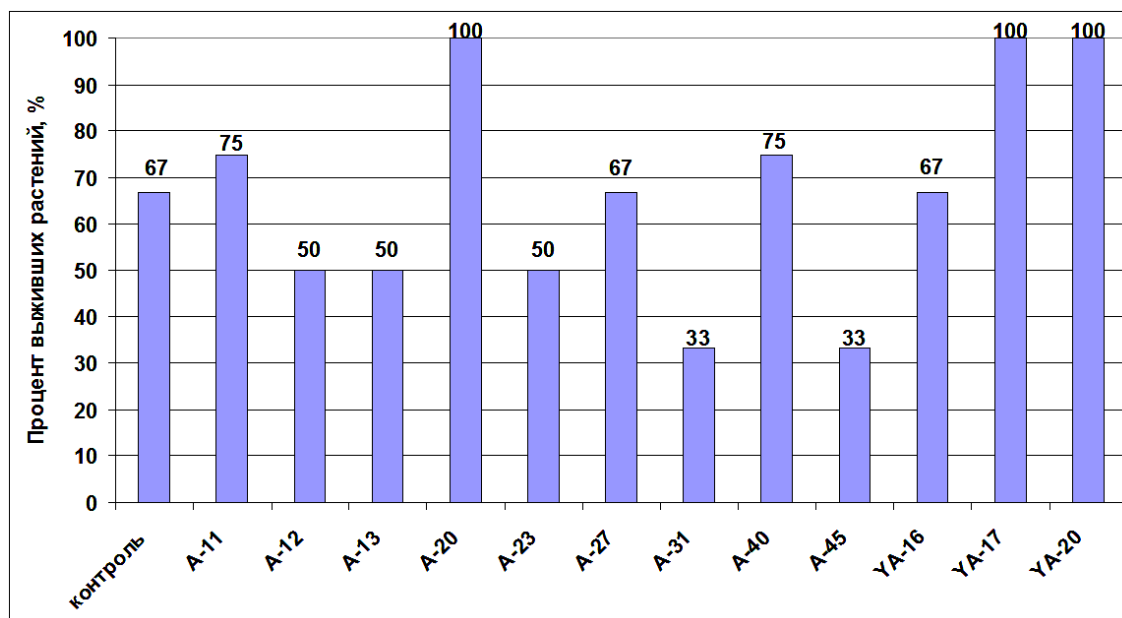


На диаграмме показана динамика выживания растений во время эксперимента: в начальной точке эксперимента (день 0) количество контрольных и трансгенных растений взято за 100% для каждой из групп, в последующих контрольных точках (день 5 и 10) количество выживших растений взято в процентах по отношению к начальному количеству в день 0. Трансгенные линии табака, несущие вставку *EcCspA*, обозначены как «А»; несущие вставку гена *EcCspA*, усиленного 5'-НТПУ Y-вируса картофеля, обозначены как «YA». В процентах обозначено количество выживших растений каждой линии на 10-й день эксперимента.

Рис. 2. Результаты эксперимента по холодоустойчивости различных линий трансгенных растений табака

At the diagram is shown plants survival dynamic during the experiment: at the start point (day 0) quantity of control and transgenic plants was marked as 100% for each group; at the following time points (days 5 and 10) number of survived plants is shown in percent relative to initial quantity of plants at day 0. Transgenic tobacco lines carrying *EcCspA* insert are marked as “A”; those carrying *EcCspA* insert enhanced with 5'-UTR of potato virus Y, are marked as “YA”. The number of survived plants at day 10 is shown in percent for each line.

Fig. 2. Results of chilling experiment for different transgenic tobacco lines



На диаграмме показано количество выживших к концу обоих экспериментов растений (количество выживших растений взято в процентах по отношению к начальному количеству).

Рис. 3. Обобщённые результаты экспериментов по холодо- и морозоустойчивости разных линий трансгенных растений табака

At the diagram is shown the quantity of survived plants after both experiments of chilling and freezing (number of survived plants is shown in percent relative to initial quantity of plants).

Fig. 3. Integrated results of chilling and freezing experiments for different transgenic tobacco lines

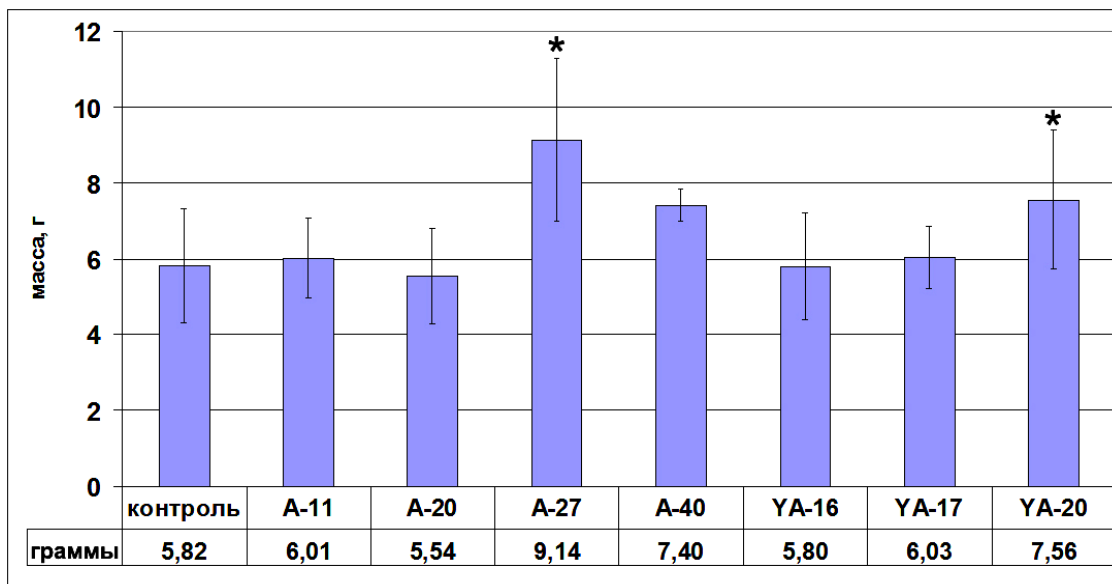


Контрольные нетрансгенные растения расположены по центру, трансгенные растения линий YA-17 и YA-20 – слева и справа соответственно.

Рис. 4. Растения табака по завершении эксперимента по морозоустойчивости

Control plants are centered, plants of transgenic lines YA-17 and YA-20 are on the left and on the right correspondingly.

Fig. 4. Tobacco plants after the freezing experiment



Звёздочками обозначены трансгенные линии табака, масса растений которых достоверно ($P \leq 0,1$ для A-27 и $P \leq 0,07$ для YA-20) отличалась от массы растений контрольной группы. В каждой группе исследовалось не менее 4-х растений, в контрольной группе – 6.

Рис. 5. Средняя масса наземной части растений табака (сырой вес) по окончании эксперимента по морозоустойчивости

Transgenic tobacco lines which raw weight reliably differs ($P \leq 0.1$ for A-27 and $P \leq 0.07$ for YA-20) from that of control plants are shown with asterisk. In each group were investigated at least 4 plants, in control group – 6.

Fig. 5. Mean raw weight of tobacco plants green part at the end of freezing experiment